

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-344489

(43)Date of publication of application : 14.12.1999

(51)Int.Cl.

G01N 33/50
G01N 1/28
G01N 33/48

(21)Application number : 10-170713

(71)Applicant : SHISEIDO CO LTD

(22)Date of filing : 02.06.1998

(72)Inventor : MORIYA YOSHIKI
TAKAHASHI MOTOTSUGU

(54) METHOD FOR DETERMINING MELANINE OF HORNY LAYER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To simply, correctly detect melamine of the skin by transferring horny layer cells of the skin to a double-sided tape attached to one face of a transparent plate, dyeing and determining the cells.

SOLUTION: An adhesive plate obtained by attaching a double-sided tape to one face of a transparent plate is brought in tight contact with a skin surface, whereby horny layer cells of the skin surface are transferred to an adhesive face. The transparent plate is a glass plate, a polyethylene plate or the like which is insoluble to an organic solvent. The glass plate having a superior transparency is preferred and formed in a size and a shape nearly close to a slide glass not obstructing a microscopic observation. An adhesive of the double-sided tape is preferably a rubber substance such as a natural rubber, a tragacanth gum or the like in terms of a separation easiness when the tape is separated from the skin. The double-sided tape is smaller than a plane of the transparent plate, has a size enabling a quantity of the horny layer cells sufficient for the microscopic observation to be transferred and is formed of cellophane, a fluororesin or the like. The horny layer cells transferred onto the transparent plate are dyed and a quantity of a dyed melamine per unit area of the horny layer cells is determined on the transparent plate.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-344489

(43) 公開日 平成11年(1999)12月14日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

G 0 1 N 33/50

G 0 1 N 33/50

Q

1/28

33/48

P

33/48

1/28

M

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平10-170713

(22) 出願日 平成10年(1998)6月2日

(71) 出願人 000001959

株式会社資生堂

東京都中央区銀座7丁目5番5号

(72) 発明者 守屋 佳樹

神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株式会社資生堂第1リサーチセンター内

(72) 発明者 高橋 元次

神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株式会社資生堂第1リサーチセンター内

(74) 代理人 弁理士 志村 光春

(54) 【発明の名称】 角層のメラニンの定量方法

(57) 【要約】

【課題】 正確性と簡便性とを兼ね備えた、皮膚のメラニンの定量手段を提供すること。

【解決手段】 透明板の片面に両面テープを貼り付けて、この両面テープの透明板との非接触面を、皮膚に密着させ、皮膚表面の角層細胞をこの粘着面に移し取り、この移し取った角質細胞に染色処理を施して、この角質細胞におけるメラニン量を上記の透明板上において定量する、角層のメラニンの定量方法を提供することにより、上記の課題を解決し得ることを見出した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】透明板の片面に両面テープを貼り付けて、この両面テープの透明板との非接触面を、皮膚に密着させ、皮膚表面の角層細胞をこの粘着面に移し取り、この移し取った角質細胞に染色処理を施して、この角質細胞におけるメラニン量を上記の透明板上において定量する、角層のメラニンの定量方法。

【請求項2】透明板がガラス板である、請求項1記載の角層のメラニンの定量方法。

【請求項3】請求項1又は2の角層のメラニンの定量方法において、透明板上に移し取って、染色処理を施した角層細胞に対して、画像処理により、角質細胞以外の要素によるノイズを、その画像において除去しつつ、角層細胞中のメラニンを定量する、角層のメラニンの定量方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、in situにおける生体成分の定量方法に関する技術分野の発明である。さらに具体的には、角層のメラニン量を、角層細胞におけるメラニン量として定量する、角層のメラニンの定量方法に関する発明である。

【0002】

【従来の技術】皮膚におけるメラニン量は、皮膚の美しさと密接に関連している要素である。すなわち、太陽光線における紫外線の作用や加齢等により、皮膚におけるメラニン量が増加し、しみやそばかすの原因となっていることは、周知の事実である。この皮膚におけるメラニン量をコントロールして、しみやそばかすを防御する目的から、いわゆる「美白化粧品」が用いられるが、かかる「美白化粧品」は、一旦発生したしみやそばかすを消去するために用いるよりも、その発生を防御するために予防的に用いることが、より好ましいことは明らかである。

【0003】このようなメラニン量を予防目的でコントロールするためには、正確に皮膚のメラニン量を把握することが可能であることは勿論のこと、手軽にこのメラニン量を把握可能であることが必要である。つまり、逐次把握したメラニン量に応じた、最も適切な美白化粧品を用いることが、皮膚のメラニン量をコントロールするためには好ましい。また、優れた美白化粧品を開発する上で、正確かつ簡便な、皮膚のメラニン量の定量手段が提供されることは、非常に好ましいことである。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、現状においては、上記の正確性と簡便性とを兼ね備えた、皮膚のメラニンの定量手段が提供されているとはいえない。

【0005】そこで、本発明が解決すべき課題は、このような正確性と簡便性を兼ね備えた、皮膚のメラニンの定量方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、この課題の解決に向けて鋭意検討した結果、透明板の片面に両面テープを貼り付けて、この両面テープに皮膚の角層細胞を移し取り、この写し取った角層細胞のメラニンを、好ましくは、角質細胞以外の要素によるノイズを画像処理で除去しつつ、定量することにより、皮膚のメラニンを簡便かつ正確に把握することが可能であることを見出し、本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明は、透明板の片面に両面テープを貼り付けて、この両面テープの透明板との非接触面を、皮膚に密着させ、皮膚表面の角層細胞をこの粘着面に移し取り、この移し取った角質細胞に染色処理を施して、この角質細胞におけるメラニン量を上記の透明板上において、好ましくは、画像処理により、角質細胞以外の要素によるノイズを、その画像において除去しつつ、角層細胞中のメラニンを定量する、角層のメラニンの定量方法を提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。本発明に係わる皮膚のメラニンの定量方法（以下、本発明メラニン定量方法という）においては、まず、透明板の片面に両面テープを貼り付けた「粘着板」を、皮膚に密着させて、皮膚表面の角質細胞をこの粘着面に移し取ることが必要である。

【0009】用いる透明板は、原則として透明で、後述するメラニンの定量を妨げず、有機溶剤に不溶若しくは難溶の素材であれば、特に限定されず、例えば、ガラス板、ポリメチルペンテン板、ポリエチレン板等が例示される。一般的には、透明性に優れるガラス板を選択することが好ましい。

【0010】透明板の大きさ及び形状は、直接顕微鏡観察を行う上で支障のない大きさであれば、特に限定されず、概ね、一般的なスライドガラスに近似した大きさ及び形状である。

【0011】透明板の片面に貼り付ける両面テープの粘着剤は、通常公知の粘着テープの粘着剤として用い得る一般的な粘着剤を用いることが可能であり、特に限定されず、例えば、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリビニルエーテル、ポリブテン、アスファルト、天然ゴム若しくはその誘導体、SBR系ゴム、NBR系ゴム、ブタジエン-ビニルピリジン系ゴム、ブチルゴム、クロロブレン系ゴム、再生ゴム、シアノアクリレート系ゴム、アラビアゴム、トラガントゴム等のゴム質等を、単独又は組み合わせて用いることができる。

【0012】これらの粘着物質の中でも、天然ゴム以下のゴム質を選択することが、テープを皮膚から剥がす際の剥離性や角質細胞自体に影響を与え難いという点において好ましい。

【0013】両面テープのテープ自体の素材としては、一般的に粘着用テープの素材として用いられている、透明性に優れたものであれば特に限定されず、例えば、セロファン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、フッ素樹脂等を用いることができる。

【0014】両面テープは、市販品を用いることが可能であり、例えば、Scotch Double-Coated Tap (3M社製)、ナイスタック (ニチバン社製)、ホットメルト (H・Bフーラ社製) 等を例示することができる。また、透明板に貼り付ける両面テープの大きさは、少なくとも透明板の平面よりも小さく、かつ、顕微鏡観察を行うのに十分な量の皮膚表面の角層細胞を皮膚から移し取ることが可能な大きさであることが好ましい。

【0015】このように、透明板の片面に両面テープを貼り付けた「粘着板」を、皮膚に密着させて、皮膚表面の角質細胞をこの粘着面に移し取ることができる。

【0016】本発明において、粘着手段として両面テープを用いることは、透明板に直接粘着剤を塗布して作出する「粘着板」を用いるよりも、粘着板を作出するのがより簡便であり、操作性に優れるという点において好ましい。

【0017】本発明メラニン定量方法においては、上述のように、透明板上に移し取った皮膚表面の角質細胞に、染色処理を施して、この角質細胞におけるメラニン量を上記の透明板上において定量することが必要である。

【0018】染色処理は、角質細胞中のメラニンを的確に染色可能な染色処理であれば、特に限定されず、例えば、銀を還元する性質を有するメラニンを、黒褐色に染色するアンモニア銀液を用いて染色し、チオ硫酸ナトリウム等で銀を定着させることにより、所望するように、角質細胞中のメラニンを in situ で染色することができる。

【0019】また、角質細胞の形態及び細胞核の存在を明確にするために、ヘマトキシリン液に標本を浸漬して、細胞核を青藍色乃至淡藍色に染色・洗浄後、これをエオジン液で処理すること等も、可能である。

【0020】このようにして作成される角質細胞標本の保存性を向上させるために、グリセリン封入や、バルサム封入や、紫外線硬化性樹脂の封入を行うこともできる。

【0021】所望するメラニンの定量は、角層細胞面積当たりの染色されたメラニン量を特定することで行うことができる。このメラニン量の特定は、上述のようにして得られた角層細胞標本を、光学顕微鏡において観察することにより行うことができる。また、ビデオスコープを用いてモニターに写し出して、観察することも可能である。

【0022】しかしながら、より所望するメラニンを定量するために、市販の画像解析システム [Mac Aspect: Mac スコープにデータ保存システムが付加されたソフトウェア (三谷商事 (株) 製) 等] を用いて、画像処理を行って、メラニンの定量を行うことが好ましい。

【0023】また、本発明メラニン定量方法においては、メラニン量を特定する際に、画像処理により、角質細胞以外の要素によるノイズを、その画像において除去しつつ、角層細胞中のメラニンを定量することが好ましい。

【0024】この画像処理により、従来のように、汚れ等のノイズを除去する化学的手段を施す工程を経ないで、簡便に、所望するメラニンの定量を行うことができる。このような画像処理は、メラニン以外の要素を、画像上から除去可能なように、プログラミングされているソフトウェアを用いることにより行うことができる。なお、このような性質を有するソフトウェアは、既に市販されている [例えば、Adobe Photoshop (アドビシステムズ ジャパン) 等]。

【0025】

【実施例】以下、実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、これらの実施例は、本発明の技術的分野を限定するべきものではない。

【0026】粘着板の作出

2. 0×2. 0 cmにカットした、両面テープ (ホットメルト: H・Bフーラ社製) の片面を剥がして、気泡がテープの中に入り込まないように注意して、消毒・乾燥済のスライドガラスの中央に貼り付けた。これを、「粘着板」(以下、単に粘着板という) として、以下の試験に供した。

【0027】角層のメラニンの定量 (1)

粘着板の角層採取面にある両面テープを剥がし、この両面テープ部分を、健康人のパネル (女性: 40歳代) の頬に、軽く貼り付け、その部分の皮膚表面の角層細胞をこの粘着面に移し取り、粘着面上において角層細胞を採取した。

【0028】この角層細胞が付着した粘着板を、蒸留水で洗浄後、フォントナマッソン銀溶液 (染色時に調製する) に、1昼夜浸漬し、メラニンを染色した。浸漬終了後、粘着板を、蒸留水で洗浄し、チオ硫酸ナトリウム溶液に接触させて、染色反応を停止した。

【0029】さらに、エオシン染色により、角質細胞の細胞質を染色後、脱水操作を施して、バルサムを封入して、角質細胞の標本を作成した。光学顕微鏡に CCD カメラ (DXD-950: ソニー製) を接続し、角層を映写し、画像解析システム [Adobe Photoshop (アドビシステムズジャパン)] で、汚れ等のメラニンの定量には直接関係が認められない要素を、画像から消去した。

【0030】第1図は、上記の画像処理前の、角質細胞の光学顕微鏡像（20倍）であり、第2図は、同画像処理後の角質細胞の光学顕微鏡像（20倍）である。

【0031】これらの写真により、粘着板に、皮膚状の角質細胞が染色されており、それらの中に銀により染色されたメラニンが認められる。そして、画像処理を施した像（第2図）が、それを施さない像（第1図）に比べて、鮮明なメラニン乃至角質細胞の染色像を提供し得ることが明らかになった。

【0032】角層のメラニンの定量（2）
色黒の女性のパネル（40歳代）と、色白の女性パネル（40歳代）について、それぞれ上記（1）に示したと同様の方法で、角質細胞の標本を作成した。それぞれの角質細胞の標本について、上記（1）と同様の方法 *

第 1 表

パネル	メラニンIndex	角層メラニン含有率（％）
色黒の女性	501	17.9
色白の女性	456	7.6

【0035】この結果により、色黒の女性ではメラニンIndex が、色白の女性よりも高く、それに呼応するように、角層のメラニン含有率は、色黒の女性の方が色白の女性よりも明らかに高く、本発明メラニン定量方法により提供される情報が、高度に信頼性が認められる情報であることを示している。

【0036】

※

*で、画像処理を施して、メラニンの定量に直接関係のない要素を除去して、それぞれMac Aspect（三谷商事（株）製）を用いて、角層細胞面積及びその細胞中のメラニンを定量し、角層中のメラニン含有率を定量した。

【0033】また、本発明メラニン定量方法の信頼性を検討するため、すでに確立しているメラニン計測機器であるメキサメーター【メキサメーターMX16：日本ユーロテック（株）】でメラニンIndex（数値が高いほど黒色であり、単位当たりのメラニン量が多いことを示す）を、それぞれのパネル毎で検討した。その結果を、第1表に示す。

【0034】

※【発明の効果】本発明により、正確性と簡便性とを兼ね備えた、皮膚のメラニンの定量手段が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】所定の画像処理前の、角質細胞の光学顕微鏡像（20倍）である。

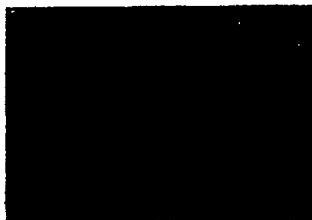
【図2】所定の画像処理後の、角質細胞の光学顕微鏡像（20倍）である。

【図1】

【図2】

図面代用写真(カラー)

第 1 図



図面代用写真(カラー)

第 2 図

